

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003 年 1 月 16 日 (16.01.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/004597 A1(51) 国際特許分類:
19/18, 19/20, G01N 30/88 C12M 1/40, C12P

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/06642

(22) 国際出願日: 2002 年 7 月 1 日 (01.07.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2001-200290 2001 年 7 月 2 日 (02.07.2001) JP
特願2002-134871 2002 年 5 月 10 日 (10.05.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社日立製作所 (HITACHI, LTD.) [JP/JP]; 〒101-8010 東京都千代田区神田駿河台四丁目 6 番地 Tokyo (JP). 東洋紡績株式会社 (TOYOBO, CO., LTD.) [JP/JP]; 〒530-8230 大阪府大阪市北区堂島浜二丁目 2 番 8 号 Osaka (JP).

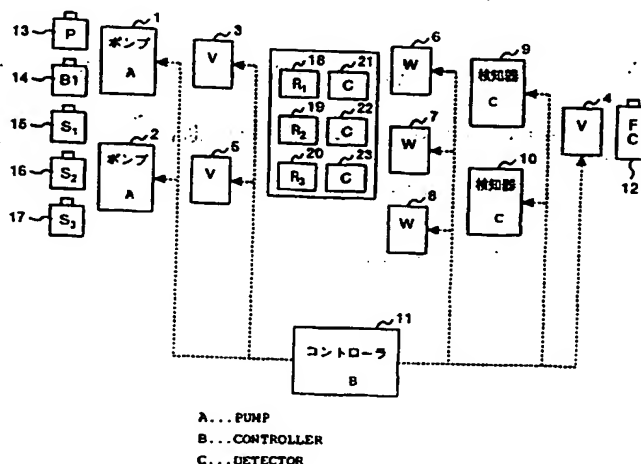
(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 出口 喜三郎 (DEGUCHI, Kisaburo) [JP/JP]; 〒312-0033 茨城県ひたちなか市大字市毛 1040 番地 株式会社日立サイエンスシステムズ内 Ibaraki (JP). 平田 源蔵 (HIRATA, Genzo) [JP/JP]; 〒312-8504 茨城県ひたちなか市大字市毛 882 番地 株式会社日立製作所計測器グループ内 Ibaraki (JP). 三浦 順吉 (MIURA, Junkichi) [JP/JP]; 〒312-8504 茨城県ひたちなか市大字市毛 882 番地 株式会社日立製作所計測器グループ内 Ibaraki (JP). 伊藤 正人 (ITO, Masahito) [JP/JP]; 〒312-8504 茨城県ひたちなか市大字市毛 882 番地 株式会社日立製作所計測器グループ内 Ibaraki (JP). 西村 紳一郎 (NISHIMURA, Shinichiro) [JP/JP]; 〒060-0009 北海道札幌市中央区北 9 条西 16 丁目 1-1-302 Hokkaido (JP). 西口 進 (NISHIGUCHI, Susumu) [JP/JP]; 〒520-0292 滋賀県大津市堅田 2 丁目 1 番 1 号 東洋紡績株式会社総合研究所内 Shiga (JP). 戸田 篤志 (TODA, Atsushi) [JP/JP]; 〒914-0047 福井県敦賀市東洋町 10 番 24 号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研

[続葉有]

(54) Title: SUGAR CHAIN SYNTHESIZER

(54) 発明の名称: 糖鎖合成装置



(57) Abstract: A sugar chain synthesizer provided with one or more reaction columns having a sugar chain transferase and/or a carbohydrate hydrolase immobilized therein; one or more separation means for separating a reaction product in the eluate from the reaction column(s) from unreacted by-products which are located in the downstream of the reaction column(s); a first pump for feeding a water-soluble polymer primer and a buffer solution to the above-described reaction column(s) via a first control valve; a second pump for feeding a buffer solution and a sugar nucleotide solution into one of the above-described reaction column(s) via a second control valve; one or more circulatory channels for connecting a channel in the downstream of the above-described separation means to a channel in the upstream of each reaction column; and a third control valve for selectively connecting the separation means with an arbitrary circulatory channel which is located between the above-described separation means and one or more circulatory channels. Use of this synthesizer makes it possible to continuously and automatically synthesize even complicated sugar chains.

[続葉有]

WO 03/004597 A1



研究所内 Fukui (JP). 中川 裕章 (NAKAGAWA, Hiroaki) [JP/JP]; 〒060-0005 北海道 札幌市 中央区北 5 条西 9 丁目 1 2 番地 6 0 1 号 Hokkaido (JP). 山田 久里子 (YAMADA, Kuriko) [JP/JP]; 〒001-0045 北海道 札幌市 北区麻生町 7 丁目 1-1-3 1 1 Hokkaido (JP). 藤山 和仁 (FUJIYAMA, Kazuhito) [JP/JP]; 〒565-0824 大阪府 吹田市 山田西 1-2 8 A 1 8-3 0 8 Osaka (JP). 関 達治 (SEKI, Tatsuji) [JP/JP]; 〒560-0083 大阪府 豊中市 新千里西町 2-1-1-1 0 1 5 Osaka (JP).

(81) 指定国 (国内): JP, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(74) 代理人: 小川 勝男 (OGAWA, Katsuo); 〒103-0025 東京都 中央区 日本橋茅場町二丁目 9 番 8 号 友泉茅場町ビル 日東国際特許事務所 Tokyo (JP).

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約:

糖転移酵素及び/または糖質加水分解酵素を固定化した一つまたは複数の反応カラムと、前記反応カラムの下流側に配置され、前記反応カラムからの溶出液中の反応生成物と未反応および副産物を分離する一つまたは複数の分離手段と、水溶性ポリマーのプライマー及びバッファー溶液を第 1 の切換バルブを介して前記反応カラムに送液する第 1 のポンプと、バッファー溶液及び糖ヌクレオチド溶液を第 2 の切換バルブを介して前記反応カラムの何れかに送液する第 2 のポンプと、前記分離手段下流側の流路と前記各反応カラムの上流側の流路を結ぶ一つまたは複数の循環流路と、前記分離手段と前記一つまたは複数の循環流路間に配置され、分離手段と任意の循環流路を選択的に連通する第 3 の切換バルブとを備えている。複雑な糖鎖合成であっても連続的、且つ、自動的に実行することが可能になる。

明細書

糖鎖合成装置

技術分野

- 5 本発明は、糖鎖の合成、分離処理の自動化を図るための糖鎖合成装置に関する。

背景技術

- 10 細胞内における複合糖質は、情報伝達や細胞間の識別、例えば、ウイルス、がん細胞、血液型の認識等の重要な役割を果たしており、糖鎖の機能解明はポストゲノム研究のターゲットの一つに位置付けられている。

- しかしながら、オリゴ核酸やペプチド合成法は、すでに確立され自動化されているが、糖鎖合成法は、まだ多くの課題を残している。糖鎖の機能解明に向けて、糖鎖合成法の確立と、効率的な合成装置の実現が望まれており、現在、以下の3つの糖鎖合成の方法が行なわれている。
- 15

- (1) 化学合成による方法
- (2) 遺伝子組換え細胞あるいは微生物による発酵法
- (3) 糖転移酵素を用いて合成する方法

- 20 前記(1)の方法は、化学結合させるOH基以外のOH基を保護しながら、目的とする糖鎖を順次合成するため、反応ステップが多く複雑になる。前記(2)の方法は、目的の糖鎖を大量に得ることができるが、その後の精製過程が複雑である。

- 前記(3)の方法は、上記(1)、(2)の複雑さを克服する方法として開発されたものであり、例えば、特開平11-42096号公報に開示されたものである。この(3)の方法では、選択的な糖転移酵素によ
- 25

る合成のため、(1)のようなOH基を保護する必要はない。また、副産物も少ないので、合成後の精製過程も容易である。

また近年、遺伝子組換え技術の発達により生理活性蛋白質を容易に調製できるようになった。しかし、大半の生理活性蛋白質は糖蛋白質であり、宿主により結合する糖鎖が異なり、活性が失われたり、著しく低下することがある。

もし、この異なってしまった糖鎖を元の糖鎖に改変できる方法があれば、非常に有用である。また、もともと結合していた糖鎖とは異なる糖鎖に改変することにより、生理機能の強化や生理活性の改変に役立つことが期待される。糖蛋白質糖鎖を改変する方法としては、大きく分けて2つの方法が現在採られている。

(A) 宿主の変更、糖転移酵素遺伝子の宿主への導入により改変した宿主を利用した発酵法

(B) 得られた糖蛋白質のエンドあるいはエキソグリコシターゼと糖転移酵素を利用した発酵法

(A)の方法では、結合する糖鎖は変わるが、必ずしも望むものに変わるとは限らない。特定の糖鎖に改変するためには(B)の方法が望ましい。エンドグリコシターゼの糖転移反応を利用した方法としては、例えば、特開平5-64594号公報などがある。エキソグリコシターゼと糖転移酵素を用いる方法としては、例えば、Eur. J. Biochem. 191:71-73(1990)などに開示されている方法がある。

しかしながら、いずれの方法もせいぜい非還元末端の糖残基を改変する程度であり、本格的な糖鎖の改変とはいえない。また、エンドグリコシターゼと糖転移酵素を用いる方法もあり、例えば、J. Am. Chem. Soc., 119:2114-2118(1997)にその方法が開示されている。ここでは、エンドグリコシターゼで加水分解した後、蛋白質上に残ったN-

アセチルグルコサミン残基の非還元末端に糖転移酵素により糖鎖を伸長させ、シアリルルイスX4糖が結合した糖蛋白質へ改変しているが、結合している糖鎖は、糖蛋白質糖鎖の非還元末端部分であり、糖鎖全体を改変するという点では不十分である。

- 5 糖鎖合成装置に関しては、特表平5-500905号公報に開示されたものがある。

発明の開示

- 上記(3)あるいは(B)の方法を用いる糖鎖の合成を実際の装置を用いて実現する際、現在は、各ステップ毎に、生成物の分離精製を行い、その後、次の反応に進むと云うバッチ方式で行われており、全ての処理を行うためには、必ず人の手を介していた。

- 上記特表平5-500905号公報に開示されている装置では、糖転移酵素を用いて単糖、オリゴ糖、糖蛋白質などを基質に糖鎖を伸長させることが可能になるが、反応させる糖の順序に応じて、反応カラムおよび分離精製手段を、シリーズに、連続的に連結することが必要になる。即ち、同種の糖を繰り返し反応させる場合であっても、その数だけ反応カラムおよび分離精製手段も必要となり、装置が大掛かりなものになると云う問題がある。また、糖鎖合成を自動的に連続して行う方法が示されていない。さらに、用いる酵素は、糖転移酵素のみであり、糖質加水分解酵素を用いるようにはなっていない。

本発明の目的は、糖鎖の合成を容易に行うことのできる糖鎖合成装置を提供することである。

- 本発明の特徴的な構成は、糖転移酵素及び/または糖質加水分解酵素を固定化した一つまたは複数の反応カラムと、当該反応カラムの下流側に配置され、前記反応カラムからの溶出液中の反応生成物と未反応およ

び副産物を分離する一つまたは複数の分離手段を備え、更に、これらを選択的に繰り返し循環させるための循環流路を備えたものである。

- 本発明においては、水溶性ポリマーのプライマーに対して糖を結合、または、解離させるために、プライマーに結合した糖を、目的の反応に必要な反応カラムに対して、容易に送液することが可能となる。したがって、所望の糖鎖の合成を容易に行うことができる。

図面の簡単な説明

- 第1図は、実施例1のシステム構成図である。
- 10 第2図は、実施例1の糖鎖合成装置の流路図である。
- 第3図は、実施例1の変形例である。
- 第4図は、実施例2のシステム構成図である。
- 第5図は、実施例2の糖鎖合成装置の流路図である。
- 第6図は、実施例3のシステム構成図である。
- 15 第7図は、実施例3の糖鎖合成装置の流路図である。
- 第8図は、実施例4のシステム構成図である。
- 第9図は、実施例4の糖鎖合成装置の流路図である。
- 第10図は、限外ろ過カラムの構成例を示す図である。

20 発明を実施するための最良の形態

〔実施例1〕

図1は、本実施例のシステム構成図である。

- 糖鎖合成装置は、複数の溶媒を選択し、時間と共にそれら溶媒を混合しながら、かつ、送液溶媒の組成を変えながら送液できる機能（いわゆる
- 25 低圧グラジエント機能）を有するポンプ1、2、流路を切り替えるためのバルブ3～8（6台）、反応カラム18～20、分離カラム21～

23, 反応生成物を検出する検知器9, 10、そして、これらを制御するコントローラ11により構成されている。

本装置で用いる検知器9には、生成物をモニターするために、例えば、屈折率検知器(RI)、紫外可視分光検知器(UV)、ダイオードアレイ吸光度検知器(DAD)が用いられる。検知器10には、分子構造情報を得るために、ダイオードアレイ吸光度検知器(DAD)、質量分析計(MS)、核磁気共鳴装置(NMR)が用いられる。

また、反応カラムは、糖転移酵素(例えば、ガラクトース転移酵素、N-アセチルグルコサミン転移酵素、N-アセチルガラクトサミン転移酵素、フコース転移酵素、シアル酸転移酵素、マンノース転移酵素等)あるいは糖質加水分解酵素(例えば、マンノシダーゼ、ガラクトシダーゼ、フコシダーゼ、シアリダーゼ、キシロシダーゼなど)を固定化したものである。糖転移酵素を固定化したカラムを用いれば、糖鎖に新たな糖を結合させて伸長させることができ、糖質加水分解酵素を固定化したカラムを用いれば、糖鎖から所定の糖を解離させる(切り離す)ことが可能になる。本実施例では、反応カラム R_n と称す。

また、反応生成物とは、水溶性ポリマーのプライマー(例えば、蛋白質、糖蛋白質、糖ペプチド、脂質、糖脂質、オリゴ糖、多糖などの生体高分子や、特開平11-42096号公報や特開2001-220399号公報に記載されているポリアクリルアミド誘導体等の合成高分子)であり、分子量10000以上のものが更に望ましい。本実施例では、以下、プライマー(P)と呼ぶと、糖(S_n)が化学結合したもの(以下、プライマー($P-S_n$)と称す。)を云う。

また、分離カラムとしては、反応生成物と糖ヌクレオチド、ヌクレオチド、あるいは加水分解により生じた単糖やオリゴ糖とを分離できる機能を有するものを用いる。例えばゲルろ過クロマトグラフィー、陽イオ

ン交換クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、透析、限外ろ過などの方法を用いたカラムが挙げられる。

図2は、本実施例の流路図である。

- 5 ポンプ1, 2は、ボトル13~17内の溶液を送液する。ここで、ボトル13はプライマー(P)、ボトル14はバッファー溶液、そして、ボトル15~17は糖ヌクレオチド溶液(例えば、ウリジン-5'-ジホスホガラクトース、ウリジン-5'-ジホスホ-N-アセチルグルコサミン、ウリジン-5'-ジホスホ-N-アセチルガラクトサミン、グ
- 10 アノシン-5'-ジホスホコース、グアノシン-5'-ジホスホマンノース、シチジン-5'-モノホスホ-N-アセチルノイラミン酸等。本実施例では、以下、 X_n-S_n と称す。)を入れたボトルである。

- 各ボトルには、ポンプに内蔵されているソレノイドバルブ101~106がそれぞれ割り当てられており、このバルブが開になった溶液がポンプで送液される。また、ボトル12は分取用ボトル(FC:フラクションコレクター)、ドレイン(1)、ドレイン(2)はドレインボトルである。
- 15

図2に基づき本装置の動作を説明する。

- ここでは、プライマーPと糖 S_1 , S_2 , S_3 は、 $P-S_1-S_2-S_3$ の順序で結合させるものと仮定する。また、反応カラムは、糖転移酵素を固定化したカラムを用いるものとする。しかし、実際には、糖 S_1 , S_2 , S_3 の順序には制限はなく、また、 $P-S_1-S_2-S_1-S_3$ と云った S_1 の繰り返しも可能である。
- 20

- 但し、 $P-S_1-S_1$ と云うように同じ糖 S_1 の繰り返しが続く場合は、ボトル16か17を糖ヌクレオチド X_1-S_1 に入ったものに置き換え、さらに反応カラム19か20を R_1 に置き換えるか、もう1流
- 25

路、即ち、反応カラムおよび分離手段（以下分離カラムと呼ぶ）を4列に拡張する。 S_2 （または S_3 ）の連続繰り返しの場合も同様である。

また、糖の解離を行う場合は、反応カラムに糖質加水分解酵素を固定化したカラムを加える。糖質加水分解酵素を固定化したカラムでの処理

5 については、糖ヌクレオチド溶液は必要としない。

$P-S_1-S_2-S_3$ の順序で反応させる場合、本装置は基本的には、次の10ステップからなる。

ステップ1：プライマー（P）および糖ヌクレオチド（ X_1-S_1 ）の反応カラム18（ R_1 ）への導入と反応。

10 ステップ2：プライマー（ $P-S_1$ ）と未反応の糖ヌクレオチド（ X_1-S_1 ）及び反応副産物であるヌクレオチド（ X_1 ）を分離カラム21（ C_1 ）で分離。

ステップ3：プライマー（ $P-S_1$ ）と糖ヌクレオチド（ X_2-S_2 ）の反応カラム19（ R_2 ）への導入。

15 ステップ4：プライマー（ $P-S_1$ ）と糖ヌクレオチド（ X_2-S_2 ）の反応と分離カラム21（ C_1 ）の洗浄。

ステップ5：プライマー（ $P-S_1-S_2$ ）と未反応の糖ヌクレオチド（ X_2-S_2 ）及び反応副産物であるヌクレオチド（ X_2 ）を分離カラム22（ C_2 ）で分離。

20 ステップ6：プライマー（ $P-S_1-S_2$ ）と糖ヌクレオチド（ X_3-S_3 ）の反応カラム20（ R_3 ）への導入。

ステップ7：プライマー（ $P-S_1-S_2$ ）と糖ヌクレオチド（ X_3-S_3 ）の反応と分離カラム22（ C_2 ）の洗浄。

25 ステップ8：プライマー（ $P-S_1-S_2-S_3$ ）と未反応の糖ヌクレオチド（ X_3-S_3 ）及び反応副産物であるヌクレオチド（ X_3 ）を分離カラム23（ C_3 ）で分離。

ステップ 9 : プライマー ($P-S_1-S_2-S_3$) の分取 (FC)。

ステップ 10 : 分離カラム 23 (C_3) の洗浄。

以下、図 2 に基づき各ステップの詳細を説明する。また、表 1 に各ステップにおける各バルブの位置について示す。

表 1

(実施例1)

ステップ														
バルブ	1 (1)	1 (2)	2	3 (1)	3 (2)	4	5	6 (1)	6 (2)	7	8	9 (1)	9 (2)	10
	導入	反応	分離	導入	反応	洗浄	分離	導入	反応	洗浄	分離	分取		洗浄
101 (7.77)	開													
102 (7.77)		開	開	開	開	開	開	開	開	開	開	開	開	開
V3	P2	P2	P2	P2	P2	P2	P3	P3	P3	P3	P4	P4	P4	P4
103 (7.77)		開	開		開	開	開		開	開	開	開	開	開
104 (X1-S1)	開													
105 (X2-S2)				開										
106 (X3-S3)								開						
V5	P2	P2	P2	P3	P3	P3	P3	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4
V4	P1	P1	P1	P3	P1	P1	P1	P4	P1	P1	P1	P5	P1	P1
W6 (7.721)	検	検	検	検	検	検	検	検	検	検	検	検	検	検
W7 (7.722)	検	検	検	D	検	検	検	検	検	検	検	検	検	検
W8 (7.723)	検	検	検	検	検	検	検	D	検	検	検	検	検	検
ポンプ 1														
ポンプ 2														
分取用														
検出器前														

ポンプ 1

ポンプ 2

分取用

検出器前

(1) ポンプ1のバルブ101, ポンプ2のバルブ104を開き、バルブ3, 5を、それぞれポジション(2)に接続し、プライマー(P)と糖ヌクレオチド(X_1-S_1)を反応カラム18(R_1)に導入する。導入量は、式(1)および(2)で示すように流量と送液時間で決まる。

送液時間を同じとした場合、プライマー（P）と糖ヌクレオチド（X
15 $_1$ -S $_1$ ）の比率は、流量比率で決まる。例えば、50%/50%のとき、ポンプ1の流量=ポンプ2の流量となる。

＜ステップ2の説明＞

反応終了後、ポンプ流量を上げて、反応カラム 18 (R_1) における反応生成物であるプライマー ($P-S_1$) と未反応の糖ヌクレオチド (X_1-S_1) および反応副産物のヌクレオチド (X_1 、糖ヌクレオチド (X_1-S_1) から糖 (S_1) が外れたもの) を分離カラム 21 (C_1) に導き、分離する。

分離モードとして、例えば、以下のものが考えられる。

(a) ゲルろ過：プライマー ($P-S_1$) の分子量がGPCカラムの排除限界を超えているならば、糖ヌクレオチド (X_1-S_1) やヌクレオチド (X_1) より早く溶出する (保持容量が小さい)。

- 5 (b) 陰イオン交換：中性であるプライマー ($P-S_1$) は保持されないが、陰イオンである糖ヌクレオチド (X_1-S_1) やヌクレオチド (X_1) はカラムに保持されることから溶出が遅れる。

- (c) 陽イオン交換：中性であるプライマー ($P-S_1$) は保持されないが、陰イオンである糖ヌクレオチド (X_1-S_1) やヌクレオチド (X_1) はイオン排除されることにより、溶出が早まる。

10 (d) 限外ろ過：分子サイズが小さい未反応糖ヌクレオチドや反応副産物であるヌクレオチドをろ過し、分子サイズが大きいプライマーと分離する。

以下のステップは、分離モード (b) を用いた場合のものである。

- 15 <ステップ3の説明>

(1) プライマー ($P-S_1$) が検知器9で検出されたら、バルブ4を反応カラム19 (R_2) のポジション (3) に切り替えると共に、バルブ7をドレイン側に切り替える。同時に、ポンプ2のバルブ105を開き、且つバルブ5を反応カラム19 (R_2) のポジション (3) にして、糖ヌクレオチド (X_2-S_2) を送液する。もし、糖ヌクレオチド (X_2-S_2) の比率が50%ならば、ポンプ1, 2の流量は同じとする (ステップ1と同じ)。

導入は、プライマー ($P-S_1$) が検出終了するまで行う。もし、プライマー ($P-S_1$) の容積がバンドの拡がりによって、ポンプ1, 2の流量×導入時間が反応カラム19 (R_2) の容積を超えてしまう場合は、導入を途中で止め (ポンプ流量=0)、導入された分を一旦、反応

させた後、残り分を再導入する必要がある。

- (2) プライマー ($P-S_1$) が、反応カラム 19 (R_2) に移行し終わったら、バルブ 4 をドレインポジション (1) に、また、バルブ 7 を元に戻す。バルブ 103 を開いてポンプ 2 の送液する溶液をバッファ 5-14 に切り替えてプライマー ($P-S_1$) と糖ヌクレオチド (X_2-S_2) を、全て反応カラム 19 (R_2) に導入する。その後、流量を下げて、例えば、流量 = 0 ml/min で一定時間反応を継続する。このとき、反応カラムへのバッファの送液は、ポンプ 2 のみで行う。

<ステップ 4 の説明>

- 10 プライマー ($P-S_1$) と糖ヌクレオチド (X_2-S_2) が反応カラム 19 (R_2) で反応している間に、ポンプ 1 は、バッファ 14 を分離カラム 21 (C_1) に流し続け、カラムに保持されている未反応糖ヌクレオチド (X_1-S_1) と反応副産物のヌクレオチド (X_1) をカラムから洗い出す。

- 15 <ステップ 5 の説明>

- プライマー ($P-S_1$) と糖ヌクレオチド (X_2-S_2) の反応終了後、バルブ 3 をポジション (3) にする。ポンプ 1, 2 によってバッファ 14 の流量を上げて、プライマー ($P-S_1-S_2$) と未反応の糖ヌクレオチド (X_2-S_2)、および反応副産物のヌクレオチド (X_2) を
20 分離カラム 22 (C_2) 内で分離する。

<ステップ 6 の説明>

- (1) プライマー ($P-S_1-S_2$) が検知器 9 で検出されたら、バルブ 4 をポジション (4) に切り替え、同時に、バルブ 8 をドレイン
ポジション (2) 側に切り替える。同時に、バルブ 5 をポジション (4
25) にして、糖ヌクレオチド (X_3-S_3) を送液する。もし、糖ヌクレオチド (X_3-S_3) の比率が 50% ならば、ポンプ 1, 2 の流量は同

じにする（ステップ1と同じ）。導入は、プライマー（ $P-S_1-S_2$ ）が検出終了するまで行う。

- (2) プライマー（ $P-S_1-S_2$ ）が、反応カラム20（ R_3 ）に移行し終わったら、バルブ4をドレインポジション（1）に切り替え、
- 5 バルブ8を元に戻す。ポンプ2をバッファ14に切り替えて、プライマー（ $P-S_1-S_2$ ）と糖ヌクレオチド（ X_3-S_3 ）を、全て反応カラム20（ R_3 ）に導入した後、バッファの送液をポンプ2のみで行うとともに、流量を下げて、例えば、流量＝0 ml/minで、一定時間反応を継続させる。

10 <ステップ7の説明>

- プライマー（ $P-S_1-S_2$ ）と糖ヌクレオチド（ X_3-S_3 ）が反応カラム20（ R_3 ）で反応している間に、ポンプ1は、バッファ14を分離カラム22（ C_2 ）に流し続け、カラムに保持されている未反応糖ヌクレオチド（ X_2-S_2 ）と反応副産物のヌクレオチド（ X_2 ）をカ
- 15 ラムから洗い出す。

<ステップ8の説明>

- プライマー（ $P-S_1-S_2$ ）と糖ヌクレオチド（ X_3-S_3 ）の反応終了後、バルブ3をポジション（4）にする。ポンプ1、2によってバッファ14の流量を上げて、水溶性ポリマー（ $P-S_1-S_2-S_3$ ）
- 20 と未反応の糖ヌクレオチド（ X_3-S_3 ）、および反応生成物ヌクレオチド（ X_3 ）を分離カラム23（ C_3 ）内で分離する。

<ステップ9の説明>

- (1) プライマー（ $P-S_1-S_2-S_3$ ）が、検知器9で検出されたら、バルブ4を分取ポジション（5）に切り替え、糖鎖合成物をボトル12（FC）に分取する。
- 25

- (2) 検知器9で検出されなくなったら、バルブ4をドレインポジ

ション (1) に戻す。

<ステップ 10 の説明>

ポンプ 1, 2 は、バッファー 14 を分離カラム 23 (C_3) に流し続け、カラムに保持されている未反応糖ヌクレオチド (X_3-S_3) と反応副産物のヌクレオチド (X_3) をカラムから洗い出す。

以上が、本実施例における糖鎖合成物 ($P-S_1-S_2-S_3$) を作成するときの手順である。

図 3 に本実施例の変形例を示す。図 3 は、検知器 10 を追加した場合の流路図である。検出器 10 は、スプリッター (Sp) を介して検出器 9 の上流に接続され、各分離カラムからの溶出成分の分子構造を得る。この図 3 の場合でも、糖鎖合成における作成手順は図 2 の場合と同様に行える。

図 3 の構成では、反応生成物の分子構造に関する情報を検出する検知器 10 を備えたことにより、合成反応が予想通りに行なわれたかどうかを、各反応毎に確認することが可能になる。もし、反応収率が、期待したレベルに到達しない場合は、次の合成反応を中止し、反応試薬と時間の無駄を省くことができると云った効果がある。

尚、本実施例では、各バルブによる流路を切り換えるタイミングとして、検出器 9 の検出結果を基に切り換える例を示したが、予定された糖の改変処理を行うものであって、予め反応カラムや分離カラムにおける溶出液の通過時間が分かっている場合は、各バルブの切り換えは、検出器 9 の結果によらずに時間経過によって制御しても良い。

[実施例 2]

図 4 は、本実施例のシステム構成図である。

糖鎖合成装置は、ボトル 13~17 の各溶媒をそれぞれ一定流量で一定時間送液できる機能を有するポンプ 1、2、24~27 (6 台)、流

路を切り変えるためのバルブ 3～8（6 台）、反応生成物を検出する検知器 9，10（2 台）、そして、これらを制御するコントローラ 11 により構成されている。本実施例で用いる検知器 9，10 は、実施例 1 と同じものである。

- 5 図 5 は、本装置の流路図である。なお、この流路図は、使用する検出器が 1 台の場合を示している。6 台のポンプ 1，2，24～27 は、コントローラ 11 による制御に従ってボトル 13～17 の溶液を、一定流量で一定時間それぞれ送液する。実施例 1 との違いは、糖ヌクレオチド溶液（ X_1-S_1 ， X_2-S_2 ， X_3-S_3 ）がそれぞれのポンプ 25，26，27 で、直接、反応カラム 18～20（ R_1 ， R_2 ， R_3 ）に送液されることである。

- 10 本実施例では、ポンプ 1 と 2 は同じバッファ 14 を送液するだけとなり、いわゆる低圧グラジエント機能は不要である。また、ポンプ 25，26，27 が、糖ヌクレオチド溶液（ X_1-S_1 ， X_2-S_2 ， X_3-S_3 ）をそれぞれのソレノイドバルブを介さず、反応カラム 18～20 に送り込める。このため、ソレノイドバルブの開閉が、ポンプの吸引過程と同期している低圧グラジエント機能と異なり、より正確に、プライマー（P）と糖ヌクレオチド溶液（ X_1-S_1 ， X_2-S_2 ， X_3-S_3 ）を送液する時間を制御することが可能になると云った効果がある。

20 [実施例 3]

図 6 は、本実施例のシステム構成図である。

- バッファ（B1，B2）14，30 をそれぞれ一定流量で一定時間送液できる機能を持ったポンプ 2 台（ポンプ 1，2），プライマー（P）13 を流路に導入するサンプルインジェクター 28，糖ヌクレオチド溶液（ X_1-S_1 ， X_2-S_2 ， X_3-S_3 ）15，16，17 を流路に導入するサンプルインジェクター 29、流路を切り替えるためのバルブ 3

～ 8 (6 台)、反応生成物を検出する検知器 9, 10 (2 台)、そして、これらを制御するコントローラ 11 により構成されている。本実施例で用いる検知器 9, 10 は、実施例 1 と同じものである。

図 7 は本装置の流路図である。なお、この流路図は、使用する検出器
5 が 1 台の場合を示している。2 台のポンプ 1, 2 は、コントローラ 11 による制御に従って、バッファ 14, 30 (必ずしもバッファをポンプごとに備える必要は無く、共通のバッファを使用することも可能。図 7 は、その際の例を示す) の溶液を、一定流量で一定時間、それぞれ送液する。実施例 1 との違いは、プライマー (P), 糖ヌクレオチド
10 溶液 (X_1-S_1 , X_2-S_2 , X_3-S_3) がサンプルインジェクター 28, 29 を用いて流路に導入され、反応カラム 18, 19, 20 (R_1 , R_2 , R_3) に、バッファ 14 (或いはバッファ 30) によって送られることである。

本実施例では、ポンプ 1, 2 はバッファ 14, 或いはバッファ 3
15 0 を送液するだけとなり、いわゆる低圧グラジエント機能は不要である。また、プライマー (P), 糖ヌクレオチド溶液 (X_1-S_1 , X_2-S_2 , X_3-S_3) は、必要な量だけサンプルインジェクターを介して、流路に導入される。このため、ソレノイドバルブの開閉が、ポンプの吸引過程と同期している低圧グラジエント機能と異なり、プライマー (P)
20 と糖ヌクレオチド溶液 (X_1-S_1 , X_2-S_2 , X_3-S_3) の無駄な消費を無くすることができると云う効果がある。

〔実施例 4〕

図 8 は、本実施例のシステム構成図であり、図 9 は流路図である。なお、この実施例において、使用する検出器は 1 台の場合でも、2 台の場合
25 合でも良い。また、予め分析時間が既値である場合は、検出器を使用せずに制御しても良い。

実施例 3 との違いは、それぞれの反応カラムに直列に接続されていた分離カラムおよびバルブを、一本の分離カラムに集約している点である。また、分離カラムに限外ろ過カラム 40 を使用した点である。

5 分離カラムを共用化したことにより、本実施例では、バルブ 6 ～ 8 に代えて、バルブ 41 が設けられる。

限外ろ過カラム 40 の構成を図 10 に示す。限外ろ過カラム 40 は、内部に円筒状の限外ろ過膜 48 を有し、更に、導入口 45 から導入された成分の内、膜を通過しないような大きな分子量の成分を排出する排出口 47 と、膜を通過した成分を排出する排出口 46 の二つの排出口を備えている。限外ろ過膜 48 は、例えば、プライマーは通過せず、糖ヌクレオチドやヌクレオチドは通過するようなものを選択する。プライマーの分子量は、約 10、000 以上であり、糖ヌクレオチドやヌクレオチドの分子量は約 400 程度である。そのために、大きさにかかなりの差があり、容易に分離可能である。

15 排出口 47 の下流には、三方バルブ 42 が設けられる。このバルブは、検出器側の流路と、何れかの排出口 46、47 を選択的に連通させるように構成される。連通されない側の排出口はバルブによって流路が遮断されることになる。

この限外ろ過カラム 40 での分離は、次のように行う。即ち、反応カラムからの溶出液が導入された当初は、三方バルブ 42 を排出口 46 側にしておき、限外ろ過膜 48 を透過したもののみを排出する。分子量の大きなプライマーとプライマーに結合した糖は、限外ろ過膜 48 内に残される。所定時間経過後、三方バルブ 42 を排出口 47 側に切り換えると、限外ろ過膜 48 内に蓄積されたプライマーとプライマーに結合した糖が検出器側に排出される。

本実施例における動作は、実施例 1 で示した動作と基本的に共通であ

る。分離カラムが共通化されているが、実施例 1 におけるバルブ 6 ～ 8 がドレインに切り替わるタイミングで、バルブ 4 1 が点線側の流路に切り換えられることで、分離カラムを共通化しても実施例 1 と同様の動作を実現することができる。

- 5 本実施例においては、分離カラムを共通化したことにより、装置構成を簡易化することができる。また、分離カラムとして限外ろ過カラムを用いることにより、プライマー（P）は、一旦限外ろ過カラム中に濃縮されることになる。従って、実施例 1 のステップ 3 で述べたようなプライマー（P）のバンドの拡がりという問題が無くなり、次の反応カラム
10 への導入が容易になると云う効果がある。

以上説明したように、本発明によれば、複雑な糖鎖合成であっても容易に実行することが可能になる。

産業上の利用可能性

- 15 本発明を糖鎖合成装置へ適用すれば、糖鎖の合成、或いは分離を容易に行うことができる。

請求の範囲

1. 糖転移酵素及び/または糖質加水分解酵素を固定化した一つまたは複数の反応カラムと、

前記反応カラムの下流側に配置され、前記反応カラムからの溶出液中
5 の反応生成物と未反応および副産物を分離する一つまたは複数の分離手段と、

水溶性ポリマーのプライマー及びバッファー溶液を第1の切換バルブを介して前記反応カラムに送液する第1のポンプと、

バッファー溶液及び糖ヌクレオチド溶液を第2の切換バルブを介し
10 て前記反応カラムの何れかに送液する第2のポンプと、

前記分離手段下流側の流路と前記各反応カラムの上流側の流路を結ぶ一つまたは複数の循環流路と、

前記分離手段と前記一つまたは複数の循環流路間に配置され、分離手段と任意の循環流路を選択的に連通する第3の切換バルブとを備えた
15 ことを特徴とする糖鎖合成装置。

2. 請求の範囲第1項において、前記第3の切換バルブには、反応生成物を分取するための分取用流路が接続される糖鎖合成装置。

3. 請求の範囲第1項において、前記第1及び第2のポンプは、開閉によって送液を行う複数のソレノイドバルブを有し且つ低圧グラジエ
20 ント機能を有するポンプであって、前記各溶液が入ったボトルは、それぞれ前記ソレノイドバルブに接続される糖鎖合成装置。

4. 請求の範囲第1項において、水溶性ポリマーのプライマー、バッファー溶液、糖ヌクレオチド溶液が入ったボトルごとに、各溶液を前記第1又は第2の切換バルブに送液するポンプを備えた糖鎖合成装置。

25 5. 請求の範囲第1項において、前記第1のポンプと前記第1の切換バルブ間の流路に、水溶性ポリマーのプライマーを導入する第1のサン

ブルインジェクターを備え、前記第2のポンプと前記第2の切換バルブ間の流路に、糖ヌクレオチド溶液を導入する第2のサンプルインジェクターを備えた糖鎖合成装置。

6. 請求の範囲第1項において、前記分離手段の下流に、分離手段からの溶出液を検出する検知器を備え、前記検知器は、屈折率検知器(RI)、紫外可視分光検知器(UV)、ダイオードアレイ吸光度検知器(DAD)の何れかである糖鎖合成装置。

7. 請求の範囲第6項において、前記分離カラムと前記検知器間の流路に、前記流路を分岐するスプリッターを備え、前記スプリッターには、溶出液の分子構造を検出可能な第2の検知器を接続する糖鎖合成装置。

8. 請求の範囲第7項において、前記第2の検知器は、ダイオードアレイ吸光度検知器(DAD)、質量分析計(MS)、核磁気共鳴装置(NMR)の何れかである糖鎖合成装置。

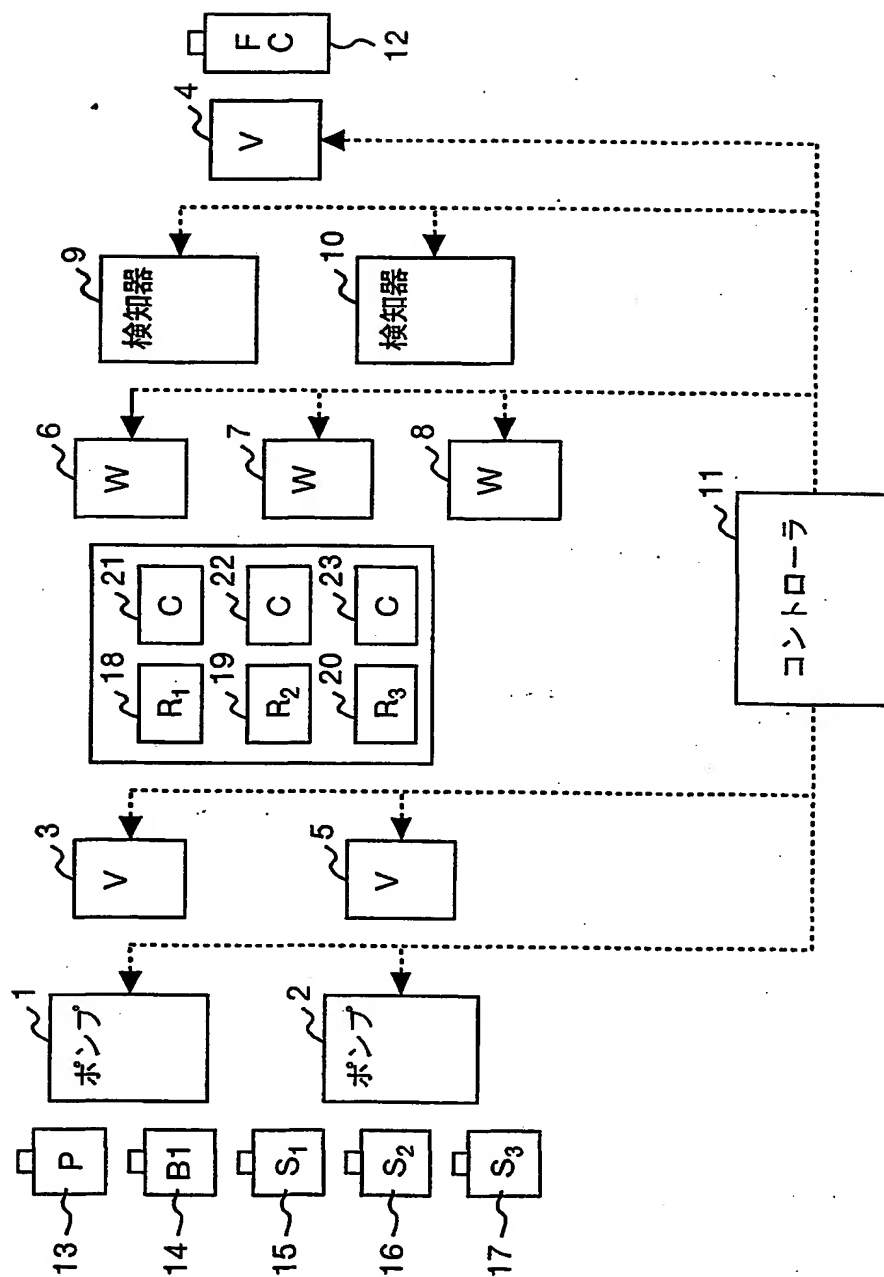
9. 請求の範囲第1項において、前記分離手段は、ゲルろ過クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、限外ろ過のいずれかである糖鎖合成装置。

10. 請求の範囲第1項において、前記反応カラムを複数備え、且つ、各反応カラムの下流に分離手段を備えた場合に、前記各分離手段の下流に、前記分離手段と前記第3の切換バルブを結ぶ流路と、前記分離手段とドレインとを結ぶ流路を選択的に切り換える第4のバルブを備えた糖鎖合成装置。

11. 請求の範囲第1項において、前記反応カラムを複数備え、且つ、各反応カラムからの溶出液を一つの分離手段に導入する場合に、前記反応カラムと前記分離手段の間に、前記反応カラムと前記分離手段を結ぶ

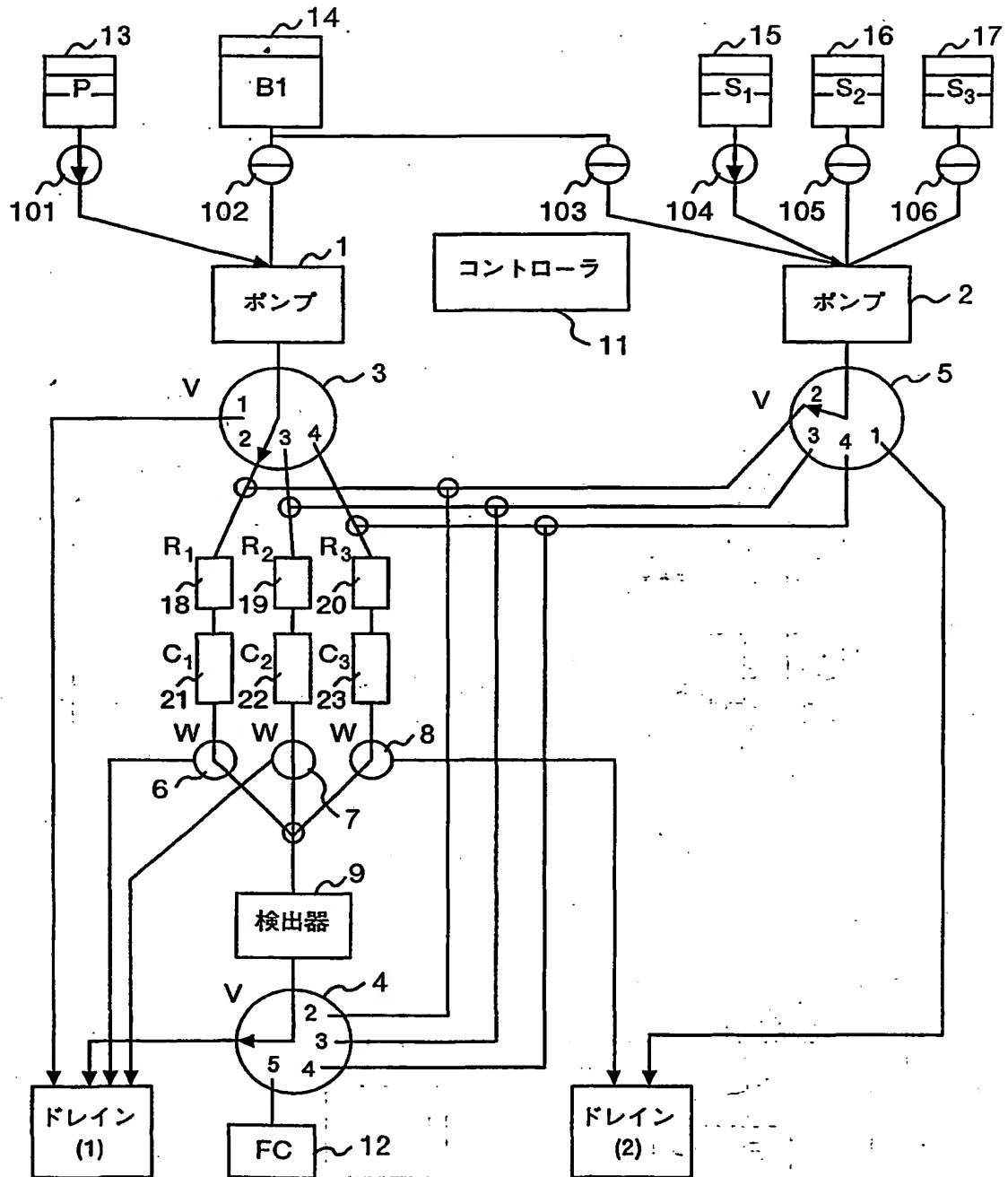
流路と、前記第 1 のバルブとドレインを結ぶ流路を形成する第 1 の状態と、前記第 1 のバルブと前記分離手段を結ぶ流路と、前記反応カラムとドレインとを結ぶ流路を形成する第 2 の状態を選択的に切り換える第 5 のバルブを備えた糖鎖合成装置。

圖一 掘



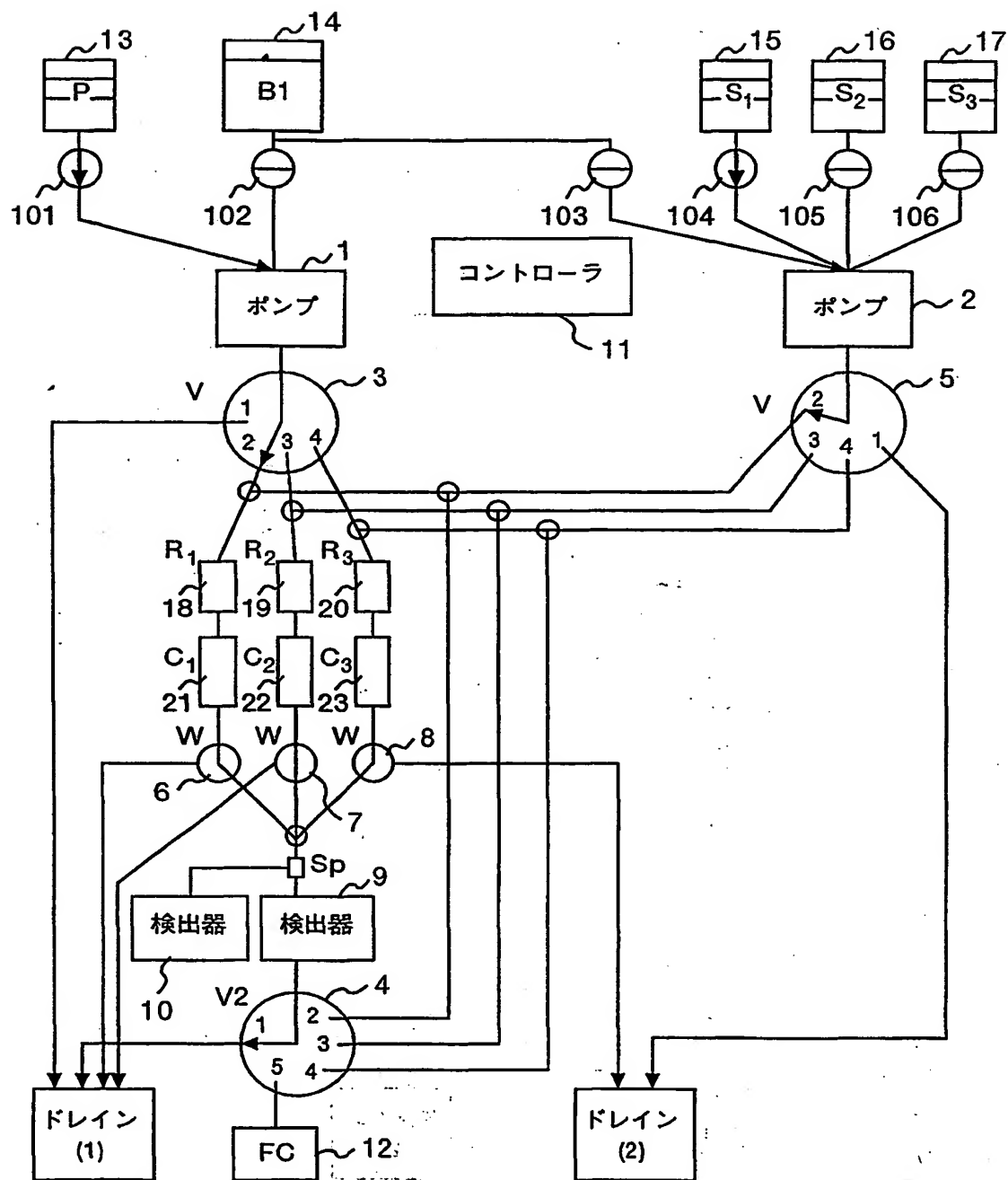
2/10

第2図



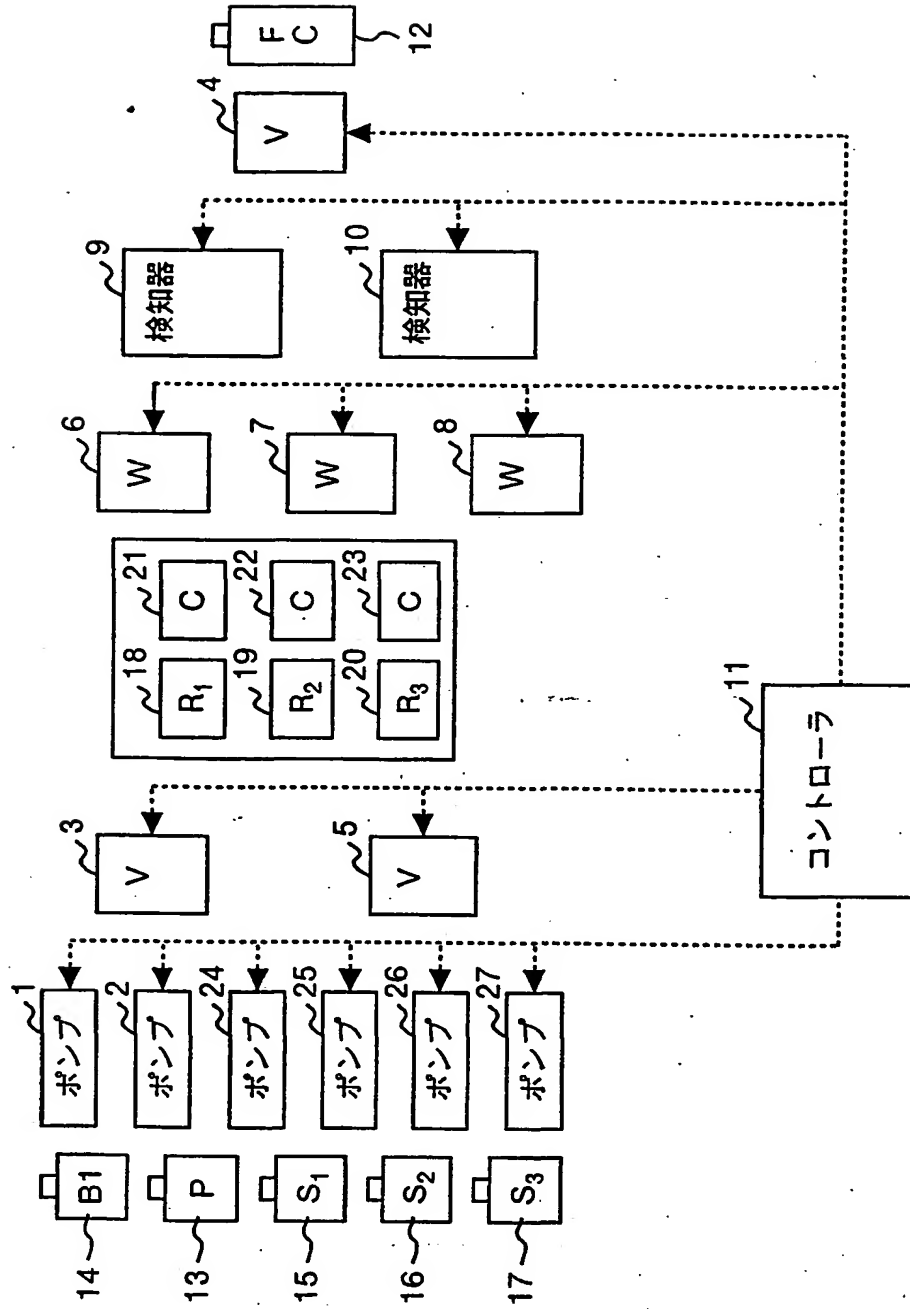
3/10

第3図



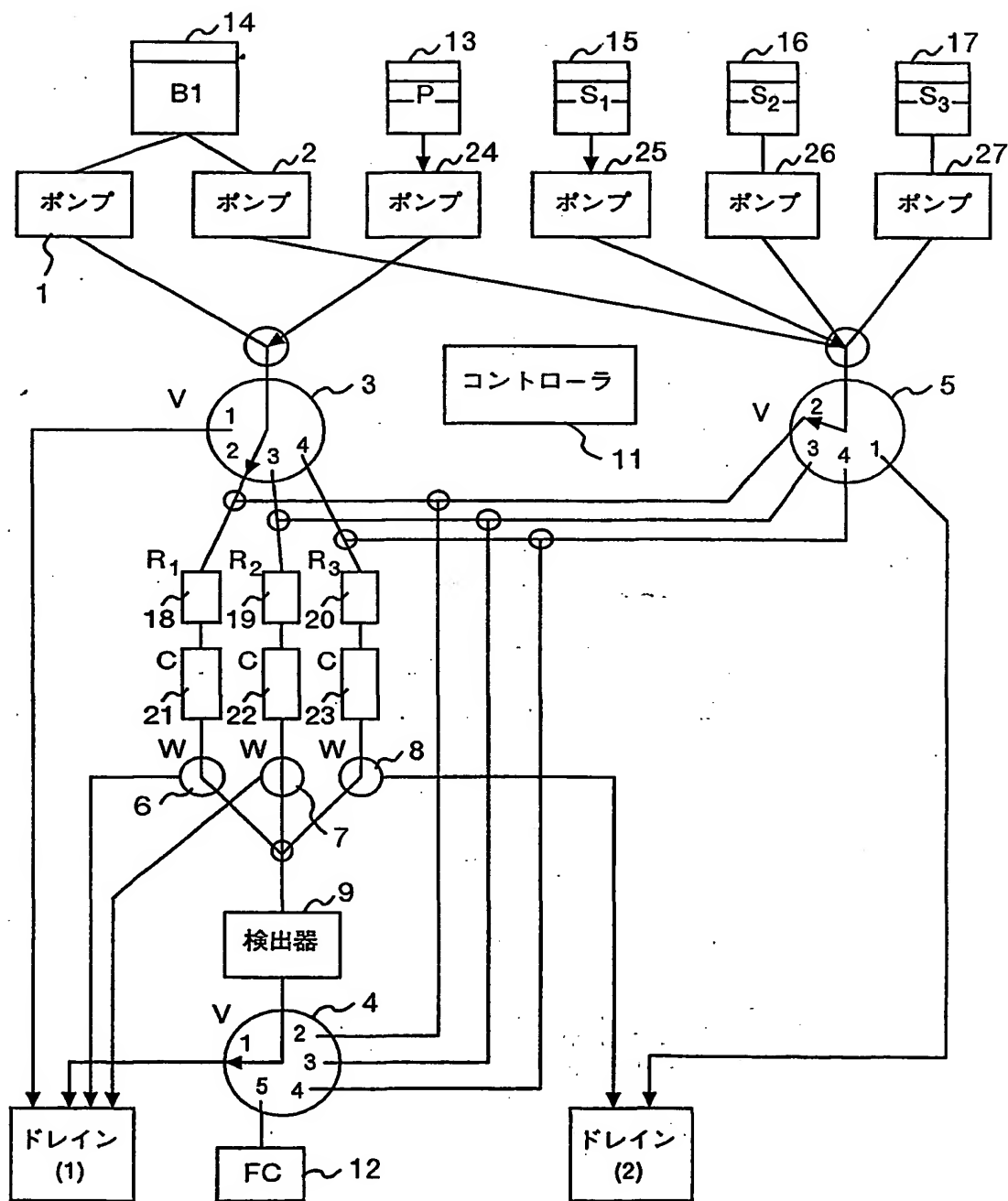
4/10

第4図



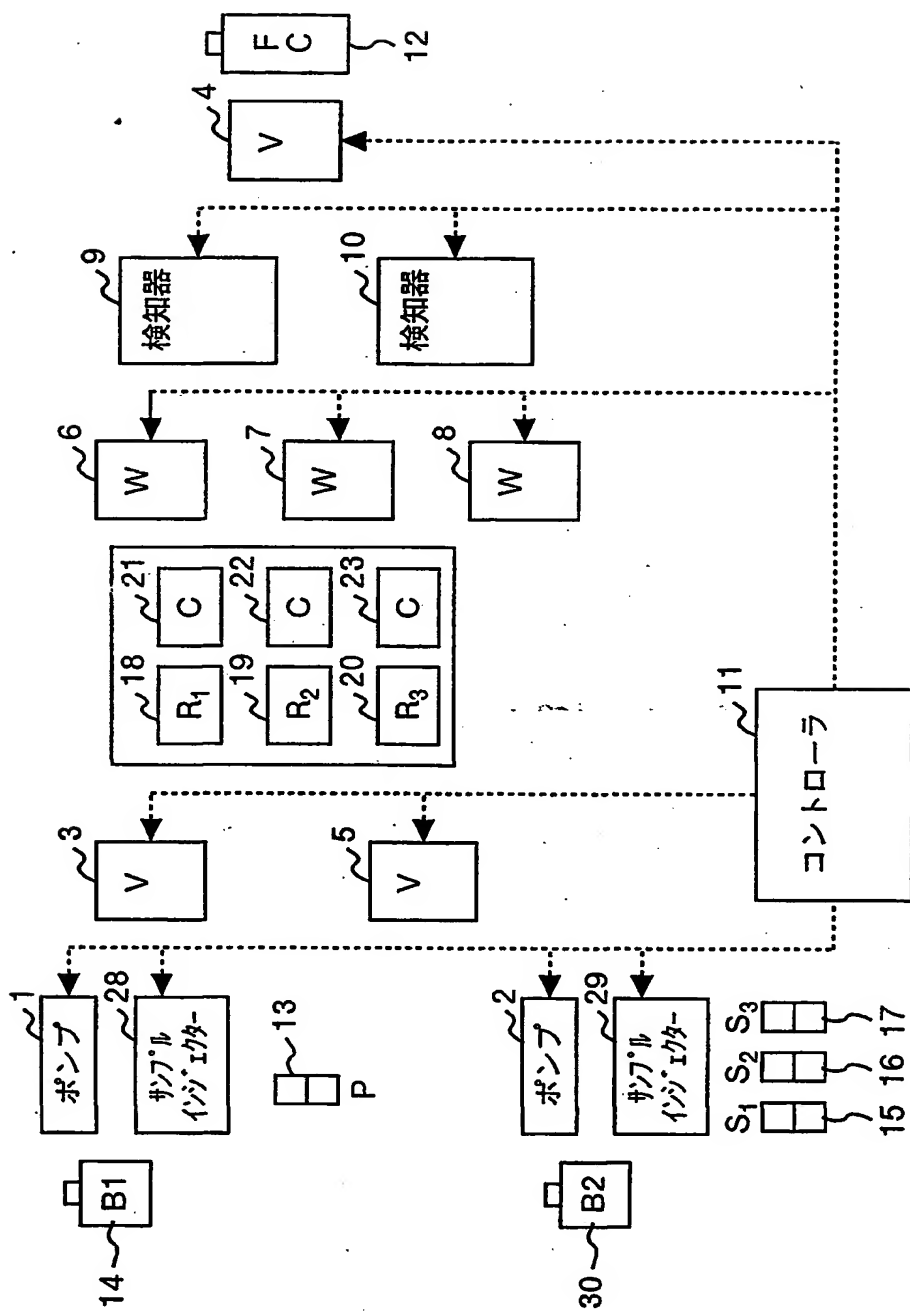
5/10

第5図



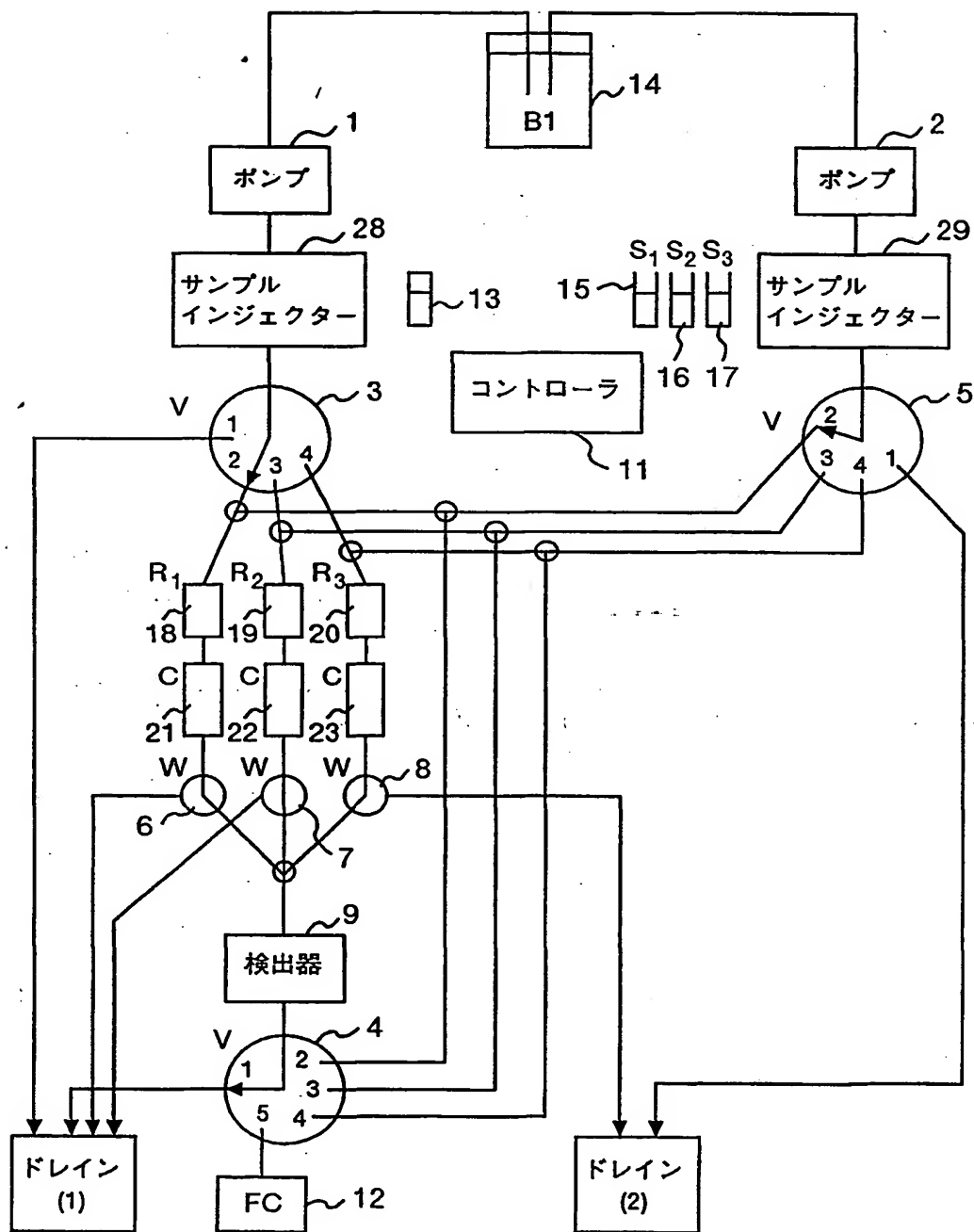
6/10

第6図

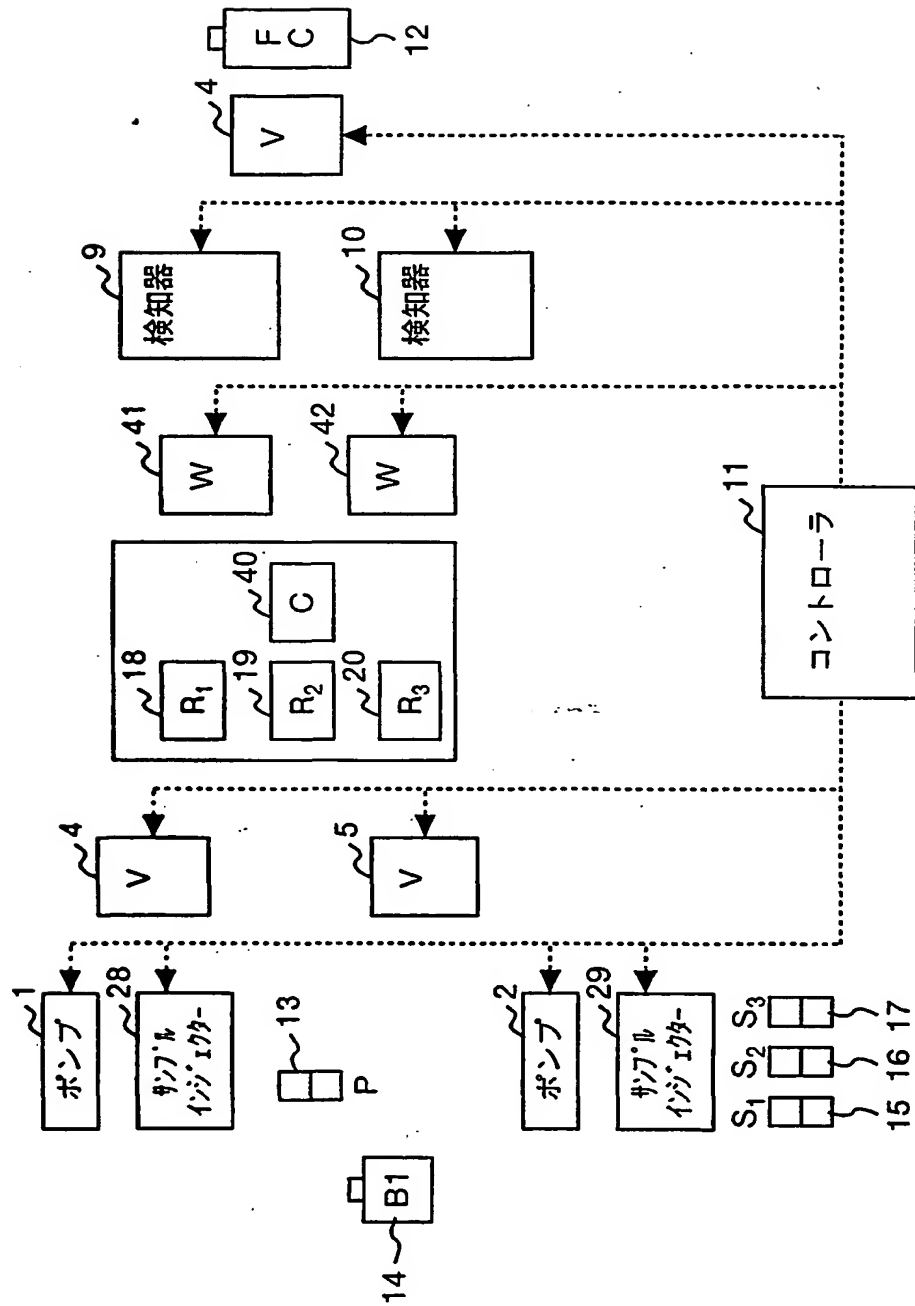


7/10

第7図

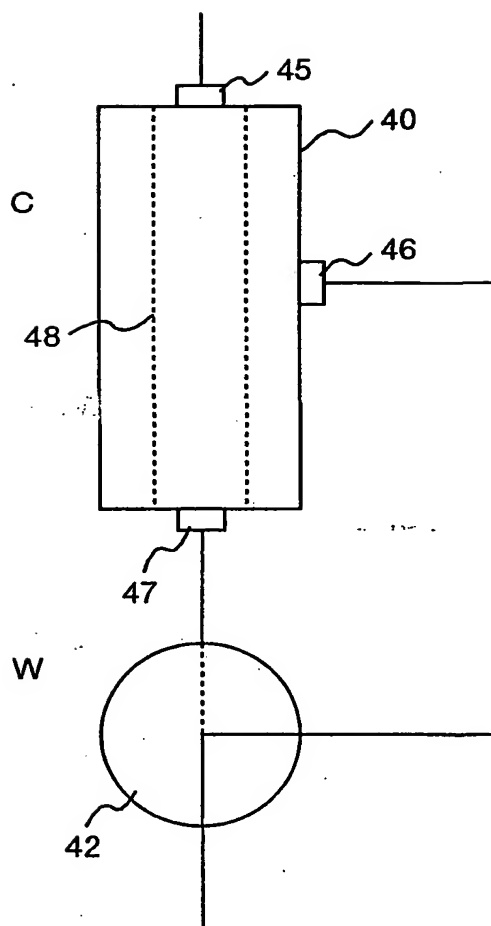


第8図



10/10

第 10 図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/06642

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12M1/40, C12P19/18, C12P19/20, G01N30/88

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12M1/00-C12M1/40, C12P19/00-C12P19/24

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 91/16449 A1 (Univ. Pennsylvania), 31 October, 1991 (31.10.91), & JP 5-500905 A & EP 481038 A1 & US 5180674 A	1-11
A	JP 11-46788 A (Ensui Sugar Refining Co., Ltd.), 23 February, 1999 (23.02.99), (Family: none)	1-11
A	JP 1-174395 A (Director General of National Food Research Institute, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries), 10 July, 1989 (10.07.89), (Family: none)	1-11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
02 September, 2002 (02.09.02)Date of mailing of the international search report
17 September, 2002 (17.09.02)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/06642

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 9-98795 A (Aomori-Ken), 15 April, 1997 (15.04.97), (Family: none)	1-11

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12M1/40, C12P19/18, C12P19/20, G01N30/88

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12M1/00~C12M1/40, C12P19/00~C12P19/24

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 91/16449 A1 (UNIV PENNSYLVANIA) 1991. 10. 31 & JP 5-500905 A&EP 481038 A1&US 5180674 A	1-11
A	JP 11-46788 A (塩水港精糖株式会社) 1999. 02. 23 (ファミリーなし)	1-11
A	JP 1-174395 A (農林水産省食品総合研究所長) 1989. 07. 10 (ファミリーなし)	1-11
A	JP 9-98795 A (青森県) 1997. 04. 15 (ファミリーなし)	1-11

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02. 09. 02

国際調査報告の発送日

17.09.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

印

4N

8114

電話番号 03-3581-1101 内線 3448